

**Università degli studi di Napoli “Federico II”**



Dipartimento di Scienze Ostetriche Ginecologiche  
Urologiche e Medicina della Riproduzione

Dipartimento di Pediatria

***Dottorato di Ricerca in Riproduzione,  
Sviluppo e Accrescimento dell’Uomo***

*Dott. Camillo Colucci Cadente*

Tutor: *Dott. Salvatore Conforti*

**Effetti di differenti strategie di trattamento  
chirurgico della endometriosi ovarica profonda  
sulla funzionalità ovarica residua: il modello  
della fecondazione *in vitro*.**

1.Introduzione	pag. 3
<i>1a. Epidemiologia e fisiopatologia dell'endometriosi</i>	pag. 3
<i>1b. Anomalie della risposta immune cellulo-mediata</i>	pag. 12
<i>1c. Anomalie della composizione del fluido peritoneale</i>	pag. 26
<i>1d. Ruolo della neoangiogenesi</i>	pag. 30
<i>1e. Caratteristiche dell'endometrio eutopico ed ectopico</i>	pag. 33
2.Obiettivi	pag. 35
3.Materiali e Metodi	pag. 37
<i>Selezione delle pazienti</i>	pag. 37
<i>Metodiche chirurgiche e di stimolazione ovarica</i>	pag. 38
<i>Analisi statistica dei dati</i>	pag. 39
4.Risultati	pag. 40
5.Discussione	pag. 43
6.Bibliografia	pag. 47
Allegati	pag. 54

## **1. Introduzione**

### *1a. Epidemiologia e fisiopatologia dell'endometriosi*

L'endometriosi è una patologia infiammatoria cronica, benigna, a carattere progressivo, caratterizzata dall'impianto e dalla crescita di tessuto endometriale (epitelio e stroma) al di fuori della cavità uterina. Gli impianti o lesioni ectopiche possono svilupparsi sulla superficie peritoneale degli organi endopelvici (endometriosi pelvica), nell'ovaio (endometriosi ovarica) o, raramente, in sede extra-pelvica.

Si tratta di una condizione assai frequente, seconda in termini di incidenza, in campo ginecologico, soltanto alla miomatosi uterina. E' stato stimato che la presenza di focolai ectopici di endometrio interessi circa il 20% della popolazione femminile in età riproduttiva (Wheeler, 1989), con manifestazioni cliniche estremamente variabili;

l'endometriosi pelvica può, infatti, rappresentare un riscontro laparoscopico occasionale, in donne del tutto asintomatiche o, più frequentemente, associarsi a sintomatologia algica (dismenorrea, dolori pelvici cronici, dispareunia). In tale caso, le manifestazioni cliniche possono assumere un carattere ingravescente, sino all'instaurarsi di una condizione fortemente debilitante. Lo sviluppo recente di numerose associazioni e/o organizzazioni internazionali di donne affette da tale patologia, rappresenta una testimonianza della valenza sociale e delle dimensioni del problema: il considerevole impatto sulla qualità di vita di tali pazienti, i risvolti di carattere economico relativi alla spesa sanitaria pubblica ed il clima di incertezza che, tuttora, si riflette nella difficoltà di elaborazione di linee guida di trattamento omogenee, hanno contribuito a rendere l'endometriosi pelvica una delle patologie di maggiore interesse, non soltanto in ambito ginecologico.



Un'ulteriore manifestazione clinica della patologia in esame è rappresentata dalla riduzione del potenziale riproduttivo. La crescita delle lesioni ectopiche può riflettersi in una risposta infiammatoria cronica intra-peritoneale e, quindi, nello sviluppo di vere e proprie sindromi aderenziali, in grado di determinare, a loro volta, importanti alterazioni morfofunzionali dell'anatomia pelvica. Pertanto, soprattutto negli stadi avanzati della patologia (vedi oltre), le possibilità di concepimento possono essere limitate dalla presenza di tali aderenze che possono riflettersi in grossolane anomalie di motilità, decorso e pervietà delle salpingi. Resta tuttavia oggetto di controversie l'associazione tra endometriosi pelvica minimo-lieve e potenziale riproduttivo. Nonostante la letteratura sia ricca di evidenze a favore di questa associazione, la realizzazione di ampi studi *prospettici randomizzati*, finalizzati a valutare l'impatto del trattamento laparoscopico dell'endometriosi pelvica, in tali stadi, sul

potenziale riproduttivo, ha dato esito a risultati contrastanti (Marcoux S. *et al.*, 1997; Parazzini F. *et al.*, 1999). Tuttavia, si ritiene che le alterazioni di carattere biochimico che investono, nel contesto della risposta infiammatoria cronica, il microambiente peritoneale, possano riflettersi in anomalie a carico delle principali fasi del processo riproduttivo, dalla interazione tra i gameti alle prime fasi dello sviluppo embrionario. L'evidenza di una sensibile riduzione dei tassi di gravidanza, in corso di tecniche di riproduzione assistita, nelle pazienti affette da endometriosi, supporta l'ipotesi di un impatto della malattia, in qualunque stadio, sul potenziale riproduttivo (Simon C. *et al.*, 1994).

Alcune evidenze della letteratura suggeriscono che i focolai ectopici di endometrio siano contrassegnati da un caratteristico decorso evolutivo che andrebbe a riflettersi, sul piano morfologico, in una considerevole eterogeneità di

aspetto. Sotto il profilo macroscopico, le lesioni evidenziabili a livello peritoneale sono state classificate come di seguito:

- *lesioni rosse* (lesioni a fiamma – *flame-like lesions* -, vescicolari, ghiandolari; aree di ipervascularizzazione);
- *lesioni nere* (lesioni a polvere da sparo – *gun shot lesions*);
- *lesioni chiare* (aree di fibrosi, cicatrici peritoneali, difetti o tasche peritoneali) (Jansen and Russell, 1986).

Recentemente, studi di microscopia ed immunoistochimica, hanno evidenziato come le lesioni rosse siano caratterizzate da un grado più elevato di infiammazione e neoangiogenesi e da un maggior indice mitotico, laddove le lesioni nere rappresenterebbero il risultato dell'accumulo dei pigmenti di emosiderina (riconducibili alla ciclica microemorragia locale, regolata dagli steroidi ovarici). Le lesioni bianche, infine, costituirebbero l'esito cicatriziale dei processi flogistici cronici e riparativi che intervengono a livello del mesotelio peritoneale.

Da queste osservazioni si è sviluppata l'ipotesi che identifica, nelle lesioni rosse, la manifestazione morfologica della fase precoce ed attiva della malattia; le lesioni pigmentate, nerastre, sarebbero tipiche della fase intermedia, ovvero rappresenterebbero il risultato del rimaneggiamento delle lesioni stesse a seguito delle cicliche microemorragie, del tutto simili a quelle dell'endometrio eutopico; le lesioni bianche sarebbero, infine, da interpretare quali espressione del processo di cicatrizzazione.

Nonostante il considerevole numero di pubblicazioni scientifiche, l'endometriosi rimane ancora oggi una malattia enigmatica, soprattutto per quanto concerne la patogenesi, la storia naturale e, come accennato, il rapporto di associazione con l'infertilità/sterilità.

Due sono le ipotesi principali, storiche, sull'eziopatogenesi dell'endometriosi: la teoria della metaplasia e quella dell'impianto.

La prima teoria suggerisce che l'endometriosi rappresenti l'esito di un processo di metaplasia che andrebbe ad investire le cellule dell'epitelio celomatico che rivestono il peritoneo pelvico.

La teoria dell'impianto identifica nel fenomeno della mestruazione retrograda (reflusso attraverso le tube di materiale endometriale in corso di mestruazione) il *primum movens* dell'endometriosi pelvica; a seguito della diffusione di cellule endometriali nel cavo peritoneale, si verificherebbero condizioni in grado di favorirne l'adesione, l'impianto e la crescita, estrogeno dipendente, sulla superficie mesoteliale che riveste gli organi endopelvici.

Sebbene in letteratura si siano accumulate evidenze a favore di entrambe le ipotesi, la teoria dell'impianto sembra godere di maggiore accreditamento ed è considerata, attualmente, il modello patogenetico di riferimento. In tale ottica, l'endometriosi dovrebbe essere considerata l'unico

caso, in patologia umana, di impianto e proliferazione in sede ectopica di un tessuto autologo non maligno. Con l'avvento della laparoscopia si è tuttavia compreso come il fenomeno, definito *mestruazione retrograda* o *reflusso tubarico*, sia da considerarsi “fisiologico”, in quanto evidenziabile in circa l'80% delle donne in età riproduttiva, in corso di mestruazione; di contro, la patologia endometriotica si instaura soltanto nel 15-20% circa di tale popolazione. Sulla base di questi presupposti, è stata ipotizzata la coesistenza di ulteriori fattori “permissivi”, in grado di favorire l'instaurarsi dei focolai ectopici. In tale ottica, il fenomeno della mestruazione retrograda è da intendersi come condizione necessaria ma non sufficiente. Con l'obiettivo di identificare gli ulteriori fattori permissivi, si sono delineati, nel corso degli ultimi anni, i principali filoni di ricerca relativi alla patogenesi di questa malattia. In primo luogo è stata ipotizzata l'esistenza di un *disposal system* locale, in grado di

rimuovere i detriti cellulari ed il materiale ematico che, ciclicamente, tendono a refluire nel cavo peritoneale. Il corretto funzionamento di tale sistema sembrerebbe essere basato sull'attività dei macrofagi peritoneali e dei linfociti *natural killer* (NK). Anomalie a carico di queste e/o altre popolazioni cellulari immunocompetenti potrebbero limitare la *clearance* intraperitoneale delle cellule endometriali e/o, paradossalmente, favorirne l'impianto ed il mantenimento. In relazione all'ipotesi di una anomalia a carico dei sistemi di rimozione, si sono sviluppate, verso la fine degli anni ottanta, le prime due linee di ricerca incentrate, rispettivamente, sullo studio della risposta immune cellulo-mediata e sulle caratteristiche del micro-ambiente peritoneale, nelle sue componenti cellulare e biochimica. Parallelamente si è compresa l'importanza dello sviluppo di un *network* neoangiogenetico perilesionale, in grado di garantire il continuo apporto di sangue e metaboliti, indispensabili allo

sviluppo ed al mantenimento dei focolai; di qui la realizzazione di una serie di sperimentazioni finalizzate alla identificazione di variabili in grado di promuovere la neoangiogenesi nelle diverse fasi di sviluppo della patologia. Tale *network* potrebbe essere mantenuto da molecole “coordinatrici” quali la leptina, che possiede qualità di immuno regolazione e induzione della neoangiogenesi. Alcuni studi hanno già dimostrato come movimenti significativi delle concentrazioni peritoneali di tale molecola siano presenti in pazienti affette da endometriosi (allegato 1) Nel corso degli ultimissimi anni, si è assistito, infine, allo sviluppo di un ulteriore filone che ha portato l’attenzione dei ricercatori verso lo studio delle caratteristiche costitutive delle cellule endometriali nelle pazienti affette, al fine di identificare eventuali anomalie in grado di favorire la sopravvivenza, l’impianto e la proliferazione delle stesse in sede ectopica.

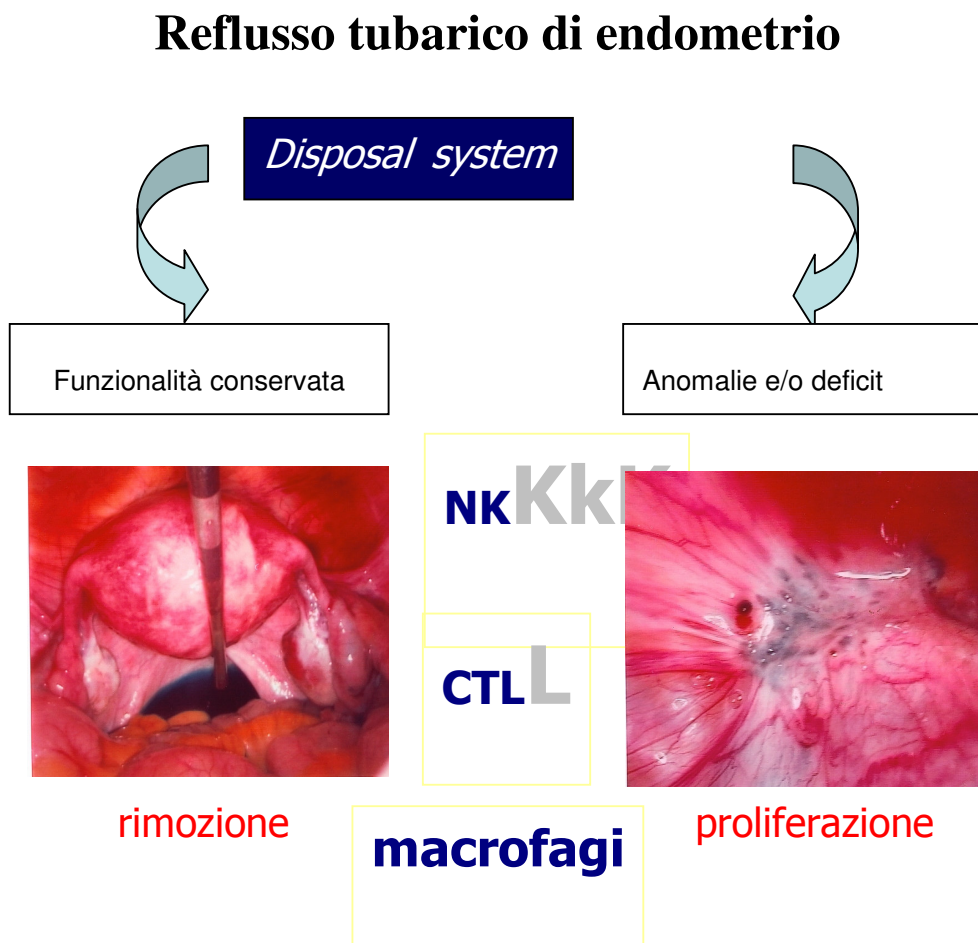


Riportiamo, qui di seguito, le principali evidenze relative a ciascuno dei filoni di ricerca sopra menzionati.

*1b. Anomalie della risposta immune cellulo-mediata*

Sulla base di numerose evidenze sperimentali, si ritiene che, nei soggetti affetti da endometriosi, la rimozione dal peritoneo degli elementi cellulari refluiti attraverso le tube non sia adeguata in relazione ad anomalie e/o deficit dei sistemi a tal fine preposti (*disposal system*) costituiti, nell'insieme, dall'attività dei linfociti T, dei linfociti NK, dei monociti del sangue periferico e dei macrofagi residenti nel peritoneo (Figura 1).

Figura 1. Rappresentazione schematica della teoria del “disposal system”, deputato alla rimozione degli elementi endometriali dal cavo peritoneale. Anomalie a carico di tale sistema potrebbero favorire l’instaurarsi dei focolai ectopici



Alcuni autori hanno chiaramente mostrato come, in corso di endometriosi, siano presenti disordini della citotossicità cellulo-mediata (Dmowsky *et al.*, 1984).

Le prime evidenze in tal senso sono state pubblicate, dal gruppo di Paul Dmowsky. Attraverso l'allestimento di un sistema sperimentale *in vitro* costituito da linfociti del sangue periferico, ottenuti da pazienti affette da endometriosi ed incubati con cellule endometriali autologhe marcate con cromo, veniva dimostrata, da un lato, l'esistenza di un'attività citotossica *versus* cellule endometriali autologhe estrapolate dal proprio ambiente e, dall'altro, come tale risposta risulti significativamente soppressa in presenza di endometriosi.

Sulla base di tali evidenze, Oosterlynck, nel tentativo di identificare, nell'ambito della risposta citotossica, le popolazioni cellulari maggiormente coinvolte, ha per la prima volta dimostrato un deficit che investe l'attività delle cellule

NK. Tale alterazione è funzionale e non numerica (Hill, 1998) e riguarda sia il sangue periferico, sia il fluido peritoneale. L'ipotesi di Oosterlynck suggeriva, quindi, che la concomitante presenza del fenomeno della mestruazione retrograda e del deficit NK, rappresentasse la condizione necessaria per lo sviluppo degli impianti e quindi della patologia. Hill (1992), partendo dal presupposto che in numerose patologie croniche è dimostrabile un decremento dell'attività NK, ha ritenuto che non è possibile escludere che il deficit osservato sia da interpretare come un epifenomeno, ovvero sia una condizione secondaria allo sviluppo degli impianti, alla flogosi ed al rilascio di molecole, quali le prostaglandine (PGs), potenzialmente in grado di modulare la risposta immune cellulo-mediata locale e sistemica. Numerose molecole, rilasciate nel microambiente peritoneale, a seguito dello sviluppo della risposta infiammatoria cronica elicitata dai focolai ectopici di endometrio, potrebbero

giustificare modificazioni a carico dell'attività NK. In tale contesto è stato sviluppato, presso il nostro Dipartimento, un filone di ricerca originale, finalizzato alla valutazione, in pazienti affette da endometriosi pelvica, delle concentrazioni sieriche delle forme solubili della *intercellular adhesion molecole* (sICAM)-1, e degli antigeni del sistema maggiore di istocompatibilità di classe I [*class I soluble human leukocyte antigen* (sHLA-I)]. La scelta di focalizzare l'attenzione su tali variabili era stata suggerita da alcune evidenze della letteratura, estrapolate da altri modelli o condizioni patologiche. E' infatti noto come un aumento dei livelli sierici delle forme solubili di tali molecole, rilasciate da cellule immunocompetenti nelle fasi precoci della risposta immune, sia evidenziabile in numerose condizioni di flogosi locale e/o sistemica (Blann *et al.*, 1995), contrassegnate da importanti analogie con l'endometriosi pelvica. Esistono inoltre evidenze suggestive di un'attività immuno-regolatoria

che, per entrambe le molecole, sembrerebbe estrinsecarsi nei confronti dell'attività NK (Becker *et al.*, 1991; Carbone *et al.*, 1996). Sulla base di questi presupposti è stato realizzato uno studio trasversale-osservazionale (*natural design*), finalizzato alla valutazione dei livelli sierici di entrambe le molecole in presenza di endometriosi (De Placido *et al.*, 1998). In particolare i dosaggi sono stati effettuati, mediante metodica *enzyme linked immunoassorbent assay* (ELISA), nel siero di 15 pazienti affette da endometriosi pelvica in differente stadio e confrontati con i risultati ottenuti in una popolazione di controllo, rappresentata da 15 soggetti sani, ovverosia senza evidenza laparoscopica di tale patologia. Le indicazioni alla laparoscopia, nel gruppo di controllo, includevano le malformazioni Mülleriane ( $n = 5$ ), la sterilità idiopatica ( $n = 7$ ) e l'esecuzione di interventi di legatura tubarica ( $n = 3$ ). La selezione delle pazienti è stata basata sul metodo cronologico, nel rispetto di criteri di inclusione ed esclusione prestabiliti.

In breve, sono stati arruolati soggetti di età compresa tra i 20 ed i 33 anni in cui era stata esclusa la presenza di altre patologie infiammatorie locali e/o sistemiche e/o di ulteriori patologie pelviche, evidenziabili in corso di laparoscopia, diverse dall'endometriosi. In ogni paziente, l'endometriosi è stata stadiata sulla base dei criteri dettati dalla *American Society for Reproductive Medicine* [(ASRM), precedentemente denominata *American Fertility Society* (AFS)], nella versione revisionata nel 1985 (*rAFS classification for endometriosis, 1985*). Inoltre, ciascuna lesione endometriosica laparoscopicamente evidente, è stata classificata come “pigmentata” o “non pigmentata”, secondo i criteri proposti da Jansen e Russell (1986). Le lesioni “pigmentate” corrispondono ai cosiddetti “focolai nerastri tipici (*gun shot lesions*), a cui si è precedentemente fatto riferimento. Di contro, col termine “lesioni non pigmentate” si è soliti far riferimento all'ampia gamma di lesioni rosse

che, come precedentemente illustrato, rappresentano, sul piano morfologico, la fase di maggiore “attività” della patologia. L’analisi della distribuzione dei dati ha consentito l’applicazione di statistica parametrica; pertanto, i livelli sierici medi delle due popolazioni di studio, per entrambe le molecole in esame, sono stati confrontati con test *t* di *Student* (due code), per campioni indipendenti. Tale analisi non ha consentito l’identificazione di differenze statisticamente significative, per entrambe le molecole, tra casi e controlli [sHLA-I pazienti =  $0.55 \pm 0.3$  *optical density units* (OD); controlli =  $0.35 \pm 0.1$  OD, ( $p = 0.06$ ); - sICAM-1 pazienti =  $0.43 \pm 0.1$  OD; controlli =  $0.44 \pm 0.1$  OD, (NS)]. Si è voluto, in una seconda fase, valutare l’effetto della presenza di focolai attivi di endometriosi, nonché dello stadio rAFS, sui livelli sierici delle molecole in esame. A tal fine è stato adottata un’*analisi di varianza* (ANOVA) a due vie, in un *within design* eseguito nelle sole pazienti affette, che ha



identificato lo stadio rAFS (fattore A: stadio I-II = categoria 1; stadio III-IV = categoria 2) e la presenza di lesioni non pigmentate (fattore B: assenti = categoria 1; presenti = categoria 2) come fattori principali (*main factors*) ed i livelli sierici di sICAM-1 e sHLA-I, come variabili dipendenti. Questo tipo di analisi ha consentito di identificare la presenza di livelli sierici significativamente più elevati di entrambe le molecole nei soggetti in stadio I-II ed in quelli con quadro laparoscopico contrassegnato dalla presenza di lesioni non pigmentate *versus*, rispettivamente, pazienti in stadio III-IV e donne senza evidenza di tali lesioni (vedi Tabella 1).

*Tabella 1. Effetti dello stadio rAFS e della presenza di lesioni non pigmentate sui livelli sierici di sICAM-1 ed sHLA-I in 15 pazienti con endometriosi*

	Stadio rAFS (fattore A)		Lesioni non pigmentate (fattore B)	
	I-II	III-IV	Assenti	Presenti
sHLA-I*	$0.99 \pm 0.16^a$	$0.33 \pm 0.18^a$	$0.38 \pm 0.26^c$	$0.88 \pm 0.3^c$
sICAM-1*	$0.54 \pm 0.06^b$	$0.38 \pm 0.08^b$	$0.38 \pm 0.08^d$	$0.53 \pm 0.08^d$

\* Livelli sierici riportati come media  $\pm$  SD, espressi come unità di densità ottica

<sup>a</sup> $F = 56.1, P = 0.0001.$

<sup>b</sup> $F = 9.6, P = 0.01.$

<sup>c</sup> $F = 13.7, P = 0.003.$

<sup>d</sup> $F = 6.8, P = 0.02.$

Interaction (A×B) sHLA-I:  $F = 0.53, P = \text{NS}.$

Interaction (A×B) sICAM-1:  $F = 0.0008, P = \text{NS}.$

L'analisi dei dati ha evidenziato una interaction non significativa tra i due fattori principali. Tale riscontro è suggestivo, almeno nella popolazione di studio, di un effetto indipendente dei due fattori stessi sui livelli sierici delle molecole in esame. In ogni caso, i risultati della sperimentazione evidenziano come, anche in presenza di uno stadio minimo-lieve, la presenza di focolai ectopici di endometrio attivi possa determinare modificazioni

significative delle concentrazioni di molecole immuno-regolatorie. Tale riscontro risulta di particolare interesse in relazione ad alcuni filoni della letteratura che sottolineano la necessità di elaborare nuovi criteri di classificazione, da integrare con quelli morfo- quantitativi suggeriti dalla ASRM. L'obiettivo dovrebbe dunque essere rappresentato da un sistema di stadiazione basato non solo sulla estensione, ma anche sulla valutazione dell'attività del processo. Restano tuttavia da definire alcuni aspetti, quali il reale impatto dell'aumento di sICAM-1 ed sHLA-I sull'attività NK, in corso di endometriosi e la "spendibilità" nella pratica clinica di questi *markers* sierici, purtroppo alquanto "aspecifici", nel *follow-up* post-trattamento e nella diagnosi di recidiva.

Un ulteriore filone della letteratura descrive alterazioni a carico dell'immunità umorale nelle pazienti affette endometriosi; Weed (1980) ha evidenziato, per la prima volta con metodi di immunofluorescenza, la presenza, a livello

endometriale, di IgG e di frazioni C<sub>3</sub> del complemento, espressione di una probabile attivazione di una reazione antigene-anticorpo, stimolata dalla presenza dei focolai ectopici di endometrio.

Successivamente, è stata riportata la presenza di un aumento di autoanticorpi (IgG anti-fosfolipidi, anti-proteine istoniche, anti-nucleotidi, anti-endometrio e anti-ovaio) nel siero, nel muco cervicale e nelle secrezioni vaginali di donne affette da endometriosi pelvica (Glaicher *et al.*, 1987). La presenza di questi autoanticorpi, sarebbe riconducibile, verosimilmente, ad un'attivazione policlonale dei linfociti B e spiegherebbe la frequente associazione dell'endometriosi con patologie autoimmuni. La presenza di autoanticorpi, anche nel fluido peritoneale, è ben correlata all'aumentata tendenza delle pazienti con endometriosi all'abortività ripetuta (Confino *et al.*, 1990). Essi interferiscono probabilmente con il trasporto degli spermatozoi (Bronson *et*

*al.*, 1984), con la fecondazione (Dunbar, 1983) e con il normale sviluppo della gravidanza (Glaicher *et al.*, 1985). La presenza di autoanticorpi e l'associazione con condizioni cliniche contrassegnate da una nota patogenesi autoimmune, hanno spinto alcuni ricercatori ad inquadrare l'endometriosi nella cornice delle patologie autoimmuni. Il riscontro nel fluido peritoneale di un aumentato rapporto CD4+/CD8+ (Badawy *et al.*, 1989) e l'espressione, da parte delle cellule endometriali ectopiche, delle molecole MHC (*major histocompatibility complex*) di classe II, sembrano accreditare tale ipotesi. Tuttavia, un aspetto rilevante delle patologie a carattere autoimmune, ovvero la lesione d'organo, non è presente, almeno in forma classica, nel quadro clinico dell'endometriosi. Pertanto, l'inquadramento nosologico della patologia, almeno per quanto concerne l'autoimmunità, resta tuttora oggetto di controversie.

### *1c. Anomalie della composizione del fluido peritoneale*

Un ulteriore filone di ricerca ha focalizzato la propria attenzione sui macrofagi peritoneali (Halme *et al.*, 1987). Tali cellule, in corso di endometriosi, sono aumentate di numero e di dimensioni, esprimono antigeni di superficie propri di uno stato di attività funzionale (HLA-DR, CD-11b, CD14), mostrano un'aumentata capacità di *capping* (ridistribuzione e raggruppamento dei recettori ad un polo della cellula) e di internalizzazione, nonché un incremento significativo dell'attività enzimatica intrinseca e di superficie. Vi è inoltre, un incremento dell'attività fagocitaria che si estrinseca soprattutto nei confronti di antigeni spermatozoari.

Le modificazioni quantitative e qualitative che investono i macrofagi peritoneali si possono correlare all'intensa risposta infiammatoria locale (Dunselman *et al.*, 1988) indotta dalla presenza delle cellule endometriali

ectopiche e, soprattutto, dal materiale ematico che tende ad accumularsi a causa degli episodi microemorragici che, ciclicamente, si ripetono nel cavo peritoneale.

Inoltre, in presenza di endometriosi, è stata ampiamente documentata la produzione, da parte degli stessi macrofagi peritoneali, di una serie di molecole solubili, potenzialmente in grado, da un lato, di favorire la proliferazione degli elementi ectopici e, quindi, il mantenimento degli impianti, dall'altro di conferire al fluido peritoneale un'elevata attività embriotossica . In particolare, esistono evidenze suggestive di un incremento delle concentrazioni intraperitoneali di PGs, EGF (*epidermal growth factor*), TGF (*transforming growth factor*)- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , FGF (*fibroblast growth factor*), TNF (*tumor necrosis factor*)- $\alpha$  ed alcune interleuchine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13) (Vinatier *et al.*, 1996; Koninckx *et al.*, 1998). Uno studio recente ha dimostrato che la stimolazione dei macrofagi peritoneali di donne affette da endometriosi

allo stadio precoce con LPS (lipopolisaccaride), induce una maggiore produzione di IL-6, IL-10 e IL-1.

Riassumendo quanto sino ad ora esposto, possiamo affermare che la presenza di un'anomala regolazione della risposta immune cellulo-mediata potrebbe associarsi o riflettersi in importanti modificazioni della composizione biochimica del fluido peritoneale. Resta da definire il nesso causale tra i dati emersi in letteratura. Secondo l'ipotesi di Oosterlynck, l'impianto sarebbe favorito da un inadeguato funzionamento del *disposal system* ed, in particolare, da un deficit primitivo delle cellule NK. Altri filoni della letteratura, supportati da modelli patogenetici proposti da Hill e Dmowsky, tendono, al contrario, a ritenere il deficit NK un epifenomeno, ovverosia una conseguenza di altre dinamiche alterate. Un significato analogo potrebbe assumere anche lo stato di disregolazione che investe la risposta umorale. Infatti, secondo una suggestiva ipotesi formulata dallo stesso



Dmowsky (1994) (vedi Figura 2), il *primum movens* della patologia potrebbe essere rappresentato da una anomalia dei monociti del sangue periferico che si rifletterebbe, a sua volta, in una disregolazione dell'attività dei macrofagi peritoneali. Questi ultimi, attivati dalla presenza di antigeni espressi da cellule endometriali senescenti, presenti nel cavo peritoneale, produrrebbero, in maniera abnorme, fattori biochimici (PGs, sICAM-1, ecc.) in grado, a lungo termine, di modulare la risposta citotossica naturale locale. Altre molecole, di verosimile origine macrofagica, potrebbero interferire con le varie fasi del processo riproduttivo. L'attivazione dei linfociti T *helper* da parte degli stessi macrofagi “anomali”, potrebbe inoltre riflettersi nella disregolazione della risposta umorale, sino alla attivazione policlonale dei linfociti B ed alla conseguenziale produzione di autoanticorpi. Per quanto suggestiva, tale ipotesi necessita di ulteriori evidenze sperimentali e cliniche.

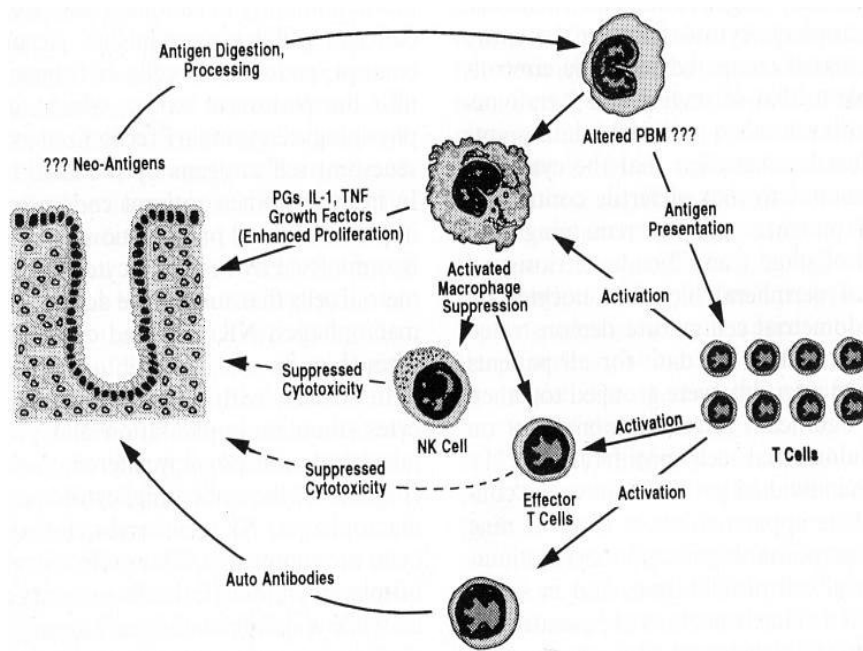


Figura 2. Modello patogenetico di Dmowsky (1994). Osservare come, sia l'attivazione policlonale dei linfociti B, sia la soppressione dei NK, siano interpretati come "effetto" secondario di un'anomala attivazione dei macrofagi peritoneali. Tale interpretazione differisce dal modello proposto da Oosterlynck, che interpreta il deficit NK come evento primitivo, in grado di favorire il successivo impianto delle cellule endometriali.

#### *1d. Ruolo della neoangiogenesi*

L'attenzione di numerosi ricercatori si è orientata, recentemente, sulla caratterizzazione dei fenomeni neoangiogenetici che si sviluppano al livello delle lesioni endometriosiche. Tale attenzione muove, in primo luogo, dal riscontro macroscopico comune, nel corso delle indagini

laparoscopiche, di chiare immagini di neo-angiogenesi perilesionale. L'analisi istologica dei focolai ectopici ha confermato l'esistenza di un cospicuo *network* vascolare neoangiogenetico, particolarmente evidente nelle lesioni rosse, focolai attivi e di recente insorgenza (Nisolle and Donnez, 1996; Healy *et al.*, 1998).

Come precedentemente illustrato, studi recenti hanno evidenziato che, nelle pazienti affette, sono aumentate, in modo significativo, le concentrazioni intraperitoneali di citochine proinfiammatorie e di fattori di crescita. In tale contesto, l'attenzione è stata rivolta all'identificazione di variabili in grado di promuovere la neoangiogenesi e quindi di giocare un ruolo importante nell'impianto e nella proliferazione ectopica delle cellule endometriali. Le prime evidenze in tal senso riguardano l'incremento dei livelli di IL-1, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . Interessanti evidenze sono state fornite a favore di un incremento significativo delle

concentrazioni di *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Donnez *et al.*, 1998), correlato con la gravità della malattia. I macrofagi peritoneali sono probabilmente la principale sorgente di VEGF, laddove gli steroidi ovarici potrebbero giocare un ruolo chiave nella regolarne la produzione.

L'IL-8, una citochina chemiotattica e angiogenetica, è aumentata nel fluido peritoneale di pazienti con endometriosi, soprattutto negli stadi precoci della malattia (Gazvani *et al.*, 1998). Anche i livelli di IL-8 sembrano essere correlati con l'estensione della malattia attiva.

E' stato inoltre ipotizzato un ruolo del *platelet-derived endothelial cell growth factor* (PD-EGF), espresso in cellule epiteliali di endometriosi ovarica, nella regolazione della crescita dell'endometrioma stesso, attraverso un aumento della neoangiogenesi sub-epiteliale. Ritornando al modello patogenetico presentato in Figura 2, l'attivazione dei macrofagi peritoneali e/o di altre popolazioni cellulari

immunocompetenti, potrebbe riflettersi nella produzione e nel rilascio locale di citochine in grado di sostenere e promuovere, anche attraverso un'intensa attività neoangiogenetica, la crescita dei focolai ectopici di endometrio.

#### *1e. Caratteristiche dell'endometrio eutopico ed ectopico*

Recentemente, alcune evidenze sperimentali hanno indotto a ritenere che l'endometrio eutopico nativo delle pazienti che sviluppano la malattia abbia delle caratteristiche diverse da quello delle donne non affette (allegato 2). Caratteristiche peculiari sono state ricercate anche a livello delle cellule ectopiche che costituiscono le lesioni peritoneali.

In particolare, esistono evidenze favore di:

1. una iperespressione del gene bcl-2 ed una ridotta apoptosi (Meresman *et al.*, 2000) delle cellule endometriali eutopiche ed ectopiche in presenza di malattia; tale

riscontro potrebbe essere alla base di una maggiore capacità di sopravvivenza, nonché di un'augmentata resistenza delle stesse alla citolisi cellulo-mediata;

2. un differente *pattern* di espressione di molecole di adesione (integrine) sulla superficie cellulare sia nell'endometrio eutopico sia in quello ectopico, che potrebbe riflettersi in una maggiore capacità di interazione ed adesione al peritoneo;
3. un differente *pattern* di secrezione di metalloproteasi (MMPs), proteine responsabili del rimodellamento della matrice extra-cellulare; tale aspetto potrebbe conferire alle cellule endometriali refluite, una maggiore capacità di impianto ed invasione del peritoneo;
4. un aumento dell'angiogenesi sia nell'endometrio eutopico sia nel peritoneo perilesionale (Donnez *et al.*, 1998; Healy *et al.*, 1998).

## **2. Obiettivi**

L'obiettivo del presente progetto di ricerca è stato quello di valutare l'efficacia terapeutica di nuove strategie di trattamento chirurgico laparoscopico della endometriosi ovarica profonda. E' noto come la tecnica di trattamento standard per l'endometrioma ovarico sia rappresentata dalla rimozione laparoscopica (*stripping*) della capsula cistica. Tale strategia è finalizzata alla prevenzione delle recidive che potrebbero aver luogo, nella cavità preformata, qualora fosse effettuato il solo svuotamento della cisti. Tuttavia, tale trattamento è gravato sia dal rischio, recentemente evidenziato, di asportazione di quote anche rilevanti di tessuto ovarico funzionale sia dal danno termico provocato dalla necessità di effettuare emostasi post-trattamento: nell'insieme queste problematiche potrebbero, almeno in parte, giustificare il riscontro di una scarsa risposta ovarica ad un trattamento con gonadotropine esogene. Di recente

sono state proposte strategie di trattamento chirurgico alternative (allegato 3): secondo recenti dati della letteratura è possibile ottenere un outcome chirurgico soddisfacente provvedendo al solo svuotamento delle cisti endometriosiche, seguito da accurata diatermocoagulazione della superficie della parete cistica e di eventuali focolai endometriosici localizzati a livello della fossetta ovarica omolaterale. In tal caso, il tessuto ovarico pericistico sarebbe risparmiato ed il danno termico ridotto in relazione alla minore necessità di effettuare emostasi elettrochirurgica. Tuttavia, non esistono in letteratura studi prospettici randomizzati impostati per confrontare, in termini di impatto sulla funzionalità ovarica, l'esito delle due strategie di trattamento. Tale è stato l'intento del presente studio.



### **3. Materiali e Metodi**

#### *Selezione delle pazienti*

Sono state selezionate per lo studio donne desiderose di prole in attesa di sottoporsi ad una tecnica di fecondazione assistita, in cui la presenza di un fattore noto di sterilità (impervietà tubarica bilaterale e/o fattore maschile severo) è associata al riscontro ultrasonografico di una massa annessiale di presunta natura endometriosa. Sono state incluse esclusivamente pazienti normogonadotrope, di età compresa tra i 19 ed i 35 anni, con body mass index (BMI) compreso tra 19 e 26 kg/m<sup>2</sup>. Sono stati adottati i seguenti criteri di esclusione: riscontro di FSH basale >10 UI/L, presenza di endocrinopatie tiroidee e/o corticosurrenaliche e/o di patologie del metabolismo, riscontro ultrasonografico e/o biochimico suggestivo di micropolicisti ovarica, presenza di disordini autoimmuni clinicamente evidenti.

### *Metodiche chirurgiche e di stimolazione ovarica*

Tutte le pazienti incluse sono state sottoposte ad intervento di laparoscopia operativa, randomizzate in due gruppi di trattamento: un gruppo è stato trattato con lo stripping, l'altro con la diatermocoagulazione. Nei 6 mesi successivi all'intervento le donne sono quindi state sottoposte a protocollo standard di induzione della super-ovulazione basato sulla soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi mediante l'antagonista del GnRH Triptorelina (Decapeptyl; Ipsen, Italia) seguita dalla stimolazione ovarica con FSH ricombinante (Gonal-F, Serono, Italia). La stimolazione ovarica è stata eseguita di volta in volta in base al quadro clinico di ogni singola paziente. La crescita follicolare è stata monitorata mediante la valutazione sierica del  $\beta$ -estradiolo e mediante ecografia.

L' end point primario dello studio è rappresentato dalla

risposta ovarica a tale stimolazione, in termini di numero di ovociti recuperati con il pick-up dall'ovaio sottoposto a trattamento. Sono stati inoltre comparati, tra le due popolazioni, i seguenti parametri: tassi di recidiva endometriosica (follow up ecografico sino all'esecuzione della tecnica di riproduzione assistita), numero di follicoli ottenuti a seguito dell'induzione della superovulazione, numero di ovociti maturi, tassi di fertilizzazione, di gravidanza e di aborto conseguenti la esecuzione della tecnica stessa.

#### *Analisi statistica dei dati*

Le caratteristiche demografiche, antropometriche ed ormonali, nonché i dati relativi alla patologia in oggetto ed alla procedura chirurgica con relativi referti istologici, una volta acquisiti, sono stati immagazzinati in appositi case registration forms per essere elaborati con software statistico al calcolatore. Per variabili continue, quali il numero di

ovociti recuperati, si è utilizzata un'analisi di varianza ad una via (ANOVA), effettuata col pacchetto statistico SPSS 12.0 per Windows.

Per variabili dicotomiche, quali i tassi di gravidanza e di recidiva, si sono impiegate tabelle 2x2 con calcolo del  $\chi^2$ .

#### **4. Risultati**

Lo studio di potenza ha indicato necessari, per l'analisi dell'end point primario, almeno 23 casi e 23 controlli; sono state selezionate per il nostro studio 84 pazienti

In 8 casi la laparoscopia, inizialmente considerata nell'iter diagnostico-terapeutico, non è risultata più necessaria, per risoluzione del quadro ecografico. In due casi la paziente ha rifiutato di sottoporsi all'intervento.

Le rimanenti 74 pazienti sono state randomizzate, secondo la tecnica dei blocchi bilanciati, in due gruppi di trattamento laparoscopico (gruppo A = Stripping, 38

pazienti gruppo B = DTC, 36 pazienti). In quattro casi del gruppo B il riscontro istologico non ha confermato la diagnosi di endometriosi, le pazienti in oggetto sono state quindi escluse dallo studio. Le caratteristiche antropometriche ed ormonali basali dei due gruppi sono risultate sovrapponibili (tabella 2)

I risultati sono riassunti nella tabella 3: l'ANOVA ad una via ha indicato un numero di ovociti significativamente più alto nel gruppo sottoposto a DTC (Gruppo A=  $6.32 \pm 1.21$  ovociti vs Gruppo B  $8.2 \pm 1.31$ ;  $p < 0.01$ ). Anche l'estradiolo al picco, importante indice di risposta alla stimolazione, è risultato significativamente più elevato nel gruppo B ( $1752.13 \pm 713.26$  vs  $1211.12 \pm 621.22$ ).

Non si sono al contrario registrate differenze statisticamente significative in termini di numero di embrioni trasferiti né di tassi di gravidanza biochimica e continuativa.

**Tabella 2**

	Gruppo A	Gruppo B
Numero di pazienti analizzate	38	32
Età (anni)	30.13 ± 1.2	29.22 ± 2.95
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	22.86 ± 1.12	22.7 ± 1.3
FSH basale	4.52 ± 0.93	5.23 ± 1.35
LH basale	3.12 ± 1.12	2.98 ± 1.05
Estradiolo al giorno 3	40.52 ± 12.23	38.2 ± 9.95

**Tabella 3**

	Gruppo A	Gruppo B
Estradiolo al giorno 5 di stimolazione		
Estradiolo al picco*	1211.12 ± 621.22	1752.13 ± 713.26
Numero di ovociti recuperati*	6.32 ± 1.21	8.2 ± 1.31
Numero di embrioni trasferiti	2.12 ± 0.55	1.91 ± 0.45
Tasso di gravidanza biochimica	28.45	30.69
Tasso di gravidanza continuativa	27.22	26.01

**\* $p < 0.01$**

## **5. Discussione**

L'endometriosi, più di quanto comunemente si ritenga, rappresenta una patologia estremamente diffusa (fino al 20%) nelle donne in età fertile. E' da tempo noto come essa possa, specialmente negli stadi più avanzati, compromettere la fertilità. Questo effetto negativo sarebbe imputabile, oltre ad una chiara compromissione dell'anatomia pelvica negli stadi avanzati, anche all'instaurarsi di un microambiente peritoneale "avverso" ed alla liberazione di citochine che comprometterebbero l'intero processo di fecondazione/impianto.

Oltre alla fertilità naturale, anche i risultati di tecniche di procreazione medicalmente assistita possono venire compromessi dalla presenza della malattia, in virtù probabilmente di una peggiore qualità ovocitaria ed una recettività endometriale alterata.

La risoluzione della patologia prima di affrontare un

ciclo di riproduzione assistita appare quindi uno *step* fondamentale ai fini di un buon esito della stessa, e l'endoscopia acquista in tale ottica un ruolo fondamentale, in quanto tecnica mini-invasiva e di comprovata efficacia.

E' quindi necessario standardizzare la tecnica impiegata a seconda del quadro specifico di malattia che si deve affrontare. Nel caso specifico degli endometriomi appare ancora aperto il dibattito su quale sia la strategia endoscopica di scelta per la rimozione delle cisti. Il punto critico non risulta tanto l'efficacia della risoluzione della malattia, quanto la quota di riserva ovarica che si riesce a preservare in vista di una induzione della crescita follicolare multipla.

I risultati del presente studio evidenziano come la diatermocoagulazione sia superiore, in termini di ovociti recuperati, al tradizionale stripping cistico. Ciò appare spiegabile con l'assunto che lo *stripping* della cisti asporti anche una certa quota di tessuto ovarico sano. Tale quota, se in pazienti giovani e normogonadotrope



può non risultare di fondamentale peso, acquisisce altresì importanza critica in pazienti potenzialmente “*poor responders*”, pazienti cioè con FSH basale alto, in età riproduttiva avanzata o comunque con un patrimonio follicolare di partenza già scarso. Considerato che una vera stima di riserva ovarica è spesso difficile da ottenersi, si dovrebbe comunque impiegare la strategia con il più alto grado di conservatività rispetto al tessuto. In prospettiva futura studi istochimici potrebbero confermare l'ipotesi che la diatermocoagulazione sia capace di conservare una quota maggiore di tessuto ovarico funzionale rispetto allo *stripping*.

Anche se una casistica più ampia sarebbe necessaria per trarre delle conclusioni sui tassi di gravidanza, dal presente studio non emerge una differenza significativa tra i due gruppi di trattamento.

Tale risultato, in ogni modo, non meravaglia dal momento che i tassi di gravidanza appaiono influenzati oltre al fattore femminile (e quindi dalla riserva ovarica

combinata a molteplici altre variabili), anche dal fattore maschile.

Se i nostri dati venissero confermati da una casistica ancora più ampia, potrebbero porre le basi per la definizione di un *gold standard* chirurgico nella terapia dell'endometriosi. Diversi studi infatti hanno permesso di porre delle raccomandazioni basate sui livelli di evidenza della Evidence Based Medicine circa la terapia medica della malattia; non esiste tuttavia in letteratura una mole sufficiente di *trials* randomizzati per tracciare delle linee guida circa la gestione endoscopica dei vari quadri di malattia.

## **5. Bibliografia**

Bartos P.

Surgical treatment of endometriosis

Ceska Gynekol. 2000 Mar;65(2):103-7. Review. Czech.

Blann AD, Herrick A, Jayson MI.

Altered levels of soluble adhesion molecules in rheumatoid arthritis, vasculitis and systemic sclerosis.

Br J Rheumatol. 1995 Sep;34(9):814-9.

Brosens IA, Brosens JJ.

Redefining endometriosis: is deep endometriosis a progressive disease?

Hum Reprod. 2000 Jan;15(1):1-3. Review. No abstract available.

Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R.

Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis.

Circ Res. 1998 Nov 16;83(10):1059-66.

Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D.

Sperm antibodies: their role in infertility.

Fertil Steril. 1984 Aug;42(2):171-83. Review.

Brosens I.

Management of ovarian endometriomas and pregnancy?

Fertil Steril. 1999 Jun;71(6):1166-7.

Canis M, Pouly JL, Tamburro S, Mage G, Wattiez A,

Bruhat MA.

Ovarian response during IVF-embryo transfer cycles after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts of >3 cm in diameter.

Hum Reprod. 2001 Dec;16(12):2583-6.

Carbone E, Terrazzano G, Colonna M, Tuosto L, Piccolella E, Franksson L,  
Palazzolo G, Perez-Villar JJ, Fontana S, Karre K,  
Zappacosta S.

Natural killer clones recognize specific soluble HLA class I molecules.

Eur J Immunol. 1996 Mar;26(3):683-9.

Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Canello R,  
Monsurro V, Islami D,  
Sarzan R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P.

Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases:

possible implications for trophoblast invasion.

Mol Hum Reprod. 2000 Oct;6(10):951-8.

Chapron C, Dubuisson JB, Fernandez B, Dousset B.

Surgical treatment of endometriosis

Rev Prat. 1999 Feb 1;49(3):276-8. French.

Confino E, Harlow L, Gleicher N.

Peritoneal fluid and serum autoantibody levels in patients with endometriosis.

Fertil Steril. 1990 Feb;53(2):242-5.

De Placido G, Alviggi C, Di Palma G, Carravetta C,  
Matarese G, Landino G, Racioppi L.

Serum concentrations of soluble human leukocyte class I antigens and of the soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis: relationship with stage and non-pigmented peritoneal lesions.

Hum Reprod. 1998 Nov;13(11):3206-10.

Dmowski WP, Gebel HM, Braun DP.

The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis.

Acta Obstet Gynecol Scand Suppl. 1994;159:7-14.  
Review.

Dmowski WP, Gebel H, Braun DP.  
Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage  
mediated cytolysis of  
endometrial cells in endometriosis.  
Hum Reprod Update. 1998 Sep-Oct;4(5):696-701.

Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle  
M.  
Vascular endothelial growth factor (VEGF) in  
endometriosis.  
Hum Reprod. 1998 Jun;13(6):1686-90.

Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JL.  
Functional aspects of peritoneal macrophages in  
endometriosis of women.  
J Reprod Fertil. 1988 Mar;82(2):707-10.

el Amrani R, Cornier E, Henry-Suchet J, Sarjdine K,  
Mayenga JM, Loysel T,  
Belaish-Allart J.  
[Comparison of 2 therapeutic strategies for severe  
endometriosis, in young women consulting for sterility  
or pain. Results in cases of chronic pelvic pain]  
Gynecol Obstet Fertil. 2001 Feb;29(2):116-22. French.

Friedman JM, Halaas JL.  
Leptin and the regulation of body weight in mammals.  
Nature. 1998 Oct 22;395(6704):763-70. Review.

Gleicher N, Friberg J.  
IgM gammopathy and the lupus anticoagulant syndrome  
in habitual aborters.  
JAMA. 1985 Jun 14;253(22):3278-81.

Gonzalez RR, Devoto L, Campana A, Bischof P.

Effects of leptin, interleukin-1alpha, interleukin-6, and transforming growth factor-beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases.  
Endocrine. 2001 Jul;15(2):157-64.

Guglielmina JN, Pennehouat G, Deval B, Benifla JL, Darai E, Crequat J, Walker-Combrouze F, Madelenat P.  
[Treatment of ovarian cysts by laparoscopy]  
Contracept Fertil Sex. 1997 Mar;25(3):218-29. French

Hachisuga T, Kawarabayashi T.  
Histopathological analysis of laparoscopically treated ovarian endometriotic cysts with special reference to loss of follicles.  
Hum Reprod. 2002 Feb;17(2):432-5.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM.  
Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene.  
Science. 1995 Jul 28;269(5223):543-6.

Halme J, Becker S, Haskill S.  
Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis.  
Am J Obstet Gynecol. 1987 Apr;156(4):783-9.

Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M.  
Angiogenesis: a new theory for endometriosis.  
Hum Reprod Update. 1998 Sep-Oct;4(5):736-40. Review

Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ.  
Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis.

Fertil Steril. 1988 Aug;50(2):216-22.

Jansen RP, Russell P.

Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathologic definition.

Am J Obstet Gynecol. 1986 Dec;155(6):1154-9.

Jones KD, Sutton C.

Fertility after laparoscopic surgery for endometriomas.

Hum Fertil (Camb). 2002 Aug;5(3):117-22. Review.

Karabacak O, Kambic R, Gursoy R, Ozeren S.

Does ovulation induction affect the pregnancy rate after laparoscopic treatment of endometriosis?

Int J Fertil Womens Med. 1999 Jan-Feb;44(1):38-42.

Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH.

Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid.

Hum Reprod Update. 1998 Sep-Oct;4(5):741-51. Review.

Loh FH, Tan AT, Kumar J, Ng SC.

Ovarian response after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts in 132 monitored cycles.

Fertil Steril. 1999 Aug;72(2):316-21.

Lok IH, Sahota DS, Rogers MS, Yuen PM.

Complications of laparoscopic surgery for benign ovarian cysts.

J Am Assoc Gynecol Laparosc. 2000 Nov;7(4):529-34.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI.

Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression.

Nature. 1998 Aug 27;394(6696):897-901.

Marcoux S, Maheux R, Berube S.

Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis.

Canadian Collaborative Group on Endometriosis.

N Engl J Med. 1997 Jul 24;337(4):217-22.

Matarese G, Alviggi C, Sanna V, Howard JK, Lord GM, Carravetta C, Fontana

S, Lechler RI, Bloom SR, De Placido G.

Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis.

J Clin Endocrinol Metab. 2000 Jul;85(7):2483-7.

Muzii L, Bianchi A, Croce C, Mancini N, Panici PB.

Laparoscopic excision of ovarian cysts: is the stripping technique a

tissue-sparing procedure?

Fertil Steril. 2002 Mar;77(3):609-14.

Parazzini F.

Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile

women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi.

Hum Reprod. 1999 May;14(5):1332-4.

Rizk B, Tan SL, Kingsland C, Steer C, Mason BA, Campbell S.

Ovarian cyst aspiration and the outcome of in vitro fertilization.

Fertil Steril. 1990 Oct;54(4):661-4.

Saleh A, Tulandi T.

Reoperation after laparoscopic treatment of ovarian endometriomas by excision

and by fenestration.

Fertil Steril. 1999 Aug;72(2):322-4.

Salem HA.

Laparoscopic excision of large ovarian cysts.



J Obstet Gynaecol Res. 2002 Dec;28(6):290-4.

Simon C, Gutierrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarin JJ, Remohi J, Pellicer A.

Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. Hum Reprod. 1994 Apr;9(4):725-9.

Weed JC, Arquembourg PC.

Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? Clin Obstet Gynecol. 1980 Sep;23(3):885-93. No abstract available.

Wheeler JM.

Epidemiology of endometriosis-associated infertility. J Reprod Med. 1989 Jan;34(1):41-6.

## Allegato 1

### LIVELLI PERITONEALI DI LEPTINA NELLA ENDOMETRIOSI PERITONEALE ED OVARICA

Carravetta C., Alviggi C., Borrelli M.L., De Luca P., Cadente Colucci C.,  
Conforti S., De Placido G.

*Università "Federico II", Napoli (Italia)  
Dipartimento di Scienze Ostetriche Ginecologiche,  
Urologiche e Medicina della Riproduzione*

#### INTRODUZIONE

L'endometriosi è una patologia ginecologica benigna caratterizzata dall'impianto e dalla crescita di tessuto endometriale al di fuori della cavità uterina.

Dai dati che emergono dalla letteratura si rileva che sono tre i principali fattori che intervengono nel complesso meccanismo di patogenesi della malattia:

- a) frequentemente sono presenti disordini nelle risposte immuni umorali e cellule mediate;
- b) in secondo luogo, nelle pazienti affette da endometriosi sono significativamente aumentati, nel fluido peritoneale, le concentrazioni di citochine proinfiammatorie, fattori di crescita, livelli di Interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuchina-8 (IL-8), fattore di necrosi tumorale-(TNF- $\beta$ ) e fattore di crescita dell'endotelio vascolare.

In ultimo la instaurazione di una fitta rete vascolare sugli impianti peritoneali è sicuramente un evento importante nello sviluppo della patologia.

La leptina è una proteina 16kDa derivante dagli adipociti ed appartenente alla classe delle citochine elicoidali. Tale proteina è codificata dal gene dell'obesità e regola l'assorbimento del cibo e la spesa energetica. I livelli di leptina in circolo sono correlati alla massa di grasso di corporeo. Uno svariato numero di stimoli può indurre rapidamente l'espressione di leptina e la sua secrezione nei topi e nell'uomo, ed uno di questi stimoli è sicuramente rappresentato dai mediatori dell'infiammazione TNF-e IL-1 (Janick et al., 1997; Mantzoros et al., 1997; Zumbach et al., 1997).

Infatti, la leptina è prodotta durante la fase della risposta infiammatoria acuta e rappresenta una semplice risposta insieme alla proteina di risposta C ed all'IL-1 $\beta$  durante la febbre ed il processo infiammatorio (Matarese, 2000a).

La forma lunga del recettore della leptina (Ob-Rb) è espresso nell'ipotalamo. È stata già dimostrata la sua presenza in tessuti extra neuronali come nelle cellule T (Lord et al., 1998), nell'endometrio (Kitawaki et al., 2000), e nelle cellule endoteliali (Sierra-honigsmann et al., 1998). Recenti evidenze suggeriscono che la leptina abbia proprietà immunoregolatrici. In particolare è stato dimostrato uno spe-

© Copyright 2002, CIC Edizioni Internazionali - Roma

Tutti i diritti riservati. È vietato riprodurre, archiviare in un sistema di riproduzione o trasmettere sotto qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo, elettronico, meccanico, per fotocopia, registrazione o altro, qualsiasi parte di questa pubblicazione senza autorizzazione scritta dell'Editore. È obbligatoria la citazione della fonte.

cifico e marcato effetto della leptina sulla risposta delle cellule T CD4+ e del loro profilo di citochine (Lord et al., 1998).

Inoltre, la leptina ha proprietà di promuovere la neoangiogenesi sia *in vivo* che *in vitro* (Bouloumie et al., 1998; Sierra-honigmann et al., 1998).

Abbiamo studiato di recente le concentrazioni di tale molecola durante l'endometriosi, dato che la leptina ha la capacità di promuovere l'angiogenesi e la risposta immune cellulo-mediata (Matarese et al., 2000b).

I nostri risultati dimostrano che concentrazione media di leptina aumenta nelle pazienti affette da endometriosi quando è confrontata con quella di donne non affette.

Il presente lavoro è stato disegnato per valutare le relazioni tra la leptina e l'endometriosi pelvica, in particolare in presenza di impianti peritoneali e di endometriosi ovarica nei differenti stadi rAFS.

## MATERIALI E METODI

Il nostro studio ha valutato 36 donne sottoposte a laparoscopia per infertilità (n = 15), per masse annessiali (n = 4), donne affette sia da infertilità che da masse annessiali (n = 5), per sterilità tubarica (n = 7) o per malformazioni congenite Mulleriane.

Le pazienti non sono state sottoposte ad alcuna terapia ormonale o farmacologica per i 3 mesi precedenti la laparoscopia. Abbiamo preso in esame solamente le pazienti con un ciclo e con una ovulazione regolare, quindi con un ciclo mestruale di durata 25-35 giorni (con una variazione di massimo 3 giorni a seconda delle donne) con un BMI tra i 19 ed i 26 kg/m<sup>2</sup> e con un rapporto normale della concentrazione di LH/FSH. I criteri di esclusione sono stati: segni clinici e/o ecografiche di PCO, diabete, malattie infiammatorie sistemiche, epatiche o tiroidee; tutte le malattie pelviche ad eccezione dell'endometriosi diagnosticata al momento della laparoscopia.

Tutte le pazienti sottoposte a laparoscopia in anestesia generale tra le 8.30 e le 11.30 dopo almeno 12 ore digiuno.

La presenza di endometriosi è stata registrata in base alla localizzazione ed alla grandezza dell'impianto peritoneale, alle aderenze, alla presenza di endometriosi ovarica superficiale e/o profonda. Per la stadiazione è stata utilizzata la classificazione dell'American Society for Reproductive Medicine. È stata effettuata una biopsia peritoneale a tutte le pazienti che presentavano evidenze laparoscopiche della malattia peritoneale per avere una conferma istopatologica. Durante l'intervento sono state praticate biopsie per la stadiazione dell'endometrio, e la fase del ciclo mestruale è stata stabilita in base ai criteri standard (Noyes et al., 1950). Tutti i campioni sono stati conservati ad una temperatura di -80°C e la concentrazione di leptina è stata stabilita con la tecnica Elisa per la leptina umana (Alexis Corporation, Laufelfingen, Switzerland).

## RISULTATI

Tra le pazienti studiate, 18 donne avevano evidenze laparoscopica e istologica di endometriosi. In 9 di queste era stato diagnosticato uno stadio della malattia tra il minimo ed il medio (stadio I-II) e 9 erano affette da uno stadio avanzato della patologia (stadio tra III-IV). Nell'ultimo gruppo 6 mostravano almeno una cisti endometriosica ovarica ed in due casi era associata a sottili aderenze annessiali. Le altre tre pazienti presentavano impianti peritoneali associati ad una o più cisti endometriosiche. Altre 18 pazienti senza evidenze laparoscopica di endometriosi hanno rappresentato il gruppo di con-



trollo. Nelle pazienti affette da endometriosi abbiamo riscontrato un significativo aumento del rapporto leptina/BMI rispetto ai controlli ( $1.41 \pm 0.67$  vs  $0.76 \pm 0.28$ ;  $p = 0.001$ ). L'analisi di regressione lineare singola ha rilevato una correlazione positiva tra la concentrazione di leptina nel PF ed il BMI sia nei controlli ( $r = 0.53$ ;  $p = 0.02$ ) che nelle donne affette da endometriosi ( $r = 0.52$ ;  $p = 0.03$ ). Nella nostra popolazione non è stato osservato nessun significativo effetto della fase del ciclo mestruale sul rapporto PF leptina/BMI. La ANOVA a due vie ha mostrato un significativo effetto della presenza degli impianti peritoneali endometriosici ( $p = 0.007$ ) ma non delle cisti endometriosiche ( $p = 0.26$ ) sul rapporto PF leptina/BMI.

Quando le donne affette da endometriosi sono state classificate in relazione allo stadio rAFS, è stato rilevato un significativo aumento del rapporto PF leptina/BMI in pazienti con la patologia allo stadio I e II comparato con quelle affette dallo stadio III-IV (PF leptina stadio I-II:  $41.7 \pm 16.7$  ng/ml vs PF leptina stadio III-IV:  $23.6 \pm 9.9$  ng/ml,  $p = 0.024$ ). Questi dati sono stati confermati con i controlli sul BMI (PF leptina/BMI stadio I-II:  $1.78 \pm 0.68$  vs PF leptina /BMI stadio III/IV  $1.05 \pm 0.43$ ,  $p = 0.01$ ).

## DISCUSSIONE

In questo studio i livelli della leptina, molecola con caratteristiche angiogeniche ed immunoregolatrici, sono stati misurati nei fluidi peritoneali di pazienti con endometriosi pelvica. In un nostro precedente studio, è stato rilevato un significativo incremento della concentrazione di leptina in donne affette.

Sebbene i livelli media nel siero dei i livelli di leptina nel PF si sono dimostrati essere significativamente più elevati nelle donne affette della patologia, non tutte hanno registrato un incremento di tali livelli (Matarese et al., 2000).

È possibile ipotizzare l'esistenza di uno specifico sottogruppo di pazienti endometriosiche con incremento della concentrazione di leptina.

Questo studio è stato progettato per identificare quali fattori influenzino la concentrazione di leptina nelle donne affette da endometriosi, mettendo in relazione le concentrazioni di leptina nel fluido peritoneale con i diversi segni laparoscopici della malattia.

In questo studio il principale dato è stato che, le pazienti con impianti peritoneali in tutti gli stadi dell'endometriosi hanno mostrato una concentrazione di leptina più alta rispetto alle donne nelle quali non sono stati registrati impianti peritoneali. Inoltre la presenza di un endometrioma ovarico non sembra avere significativi effetti sulla concentrazione di leptina. Questi dati suggeriscono che, il fattore che influenza la concentrazione di leptina nel fluido peritoneale è costituito dalla presenza di lesioni peritoneali, ma non dalla presenza di cisti endometriosiche ovariche.

Dalla analisi della letteratura, questo rappresenta la prima evidenza che correla una variabile biochimica con i differenti aspetti della endometriosi pelvica. Le differenze della concentrazione di leptina nel PF tra pazienti con impianti peritoneali e pazienti con endometrioma ovarico potrebbero essere dovute a differenti patterns di secrezione nelle due condizioni, avvalorando l'ipotesi di differenti patogenesi. In alternativa, è anche possibile che la leptina sia libera di diffondersi nel PF in caso di patologia peritoneale laddove, potrebbe essere sequestrata nel liquido cistico dell'endometrioma.

Nel nostro precedente studio (Matarese, 2000), suggerivamo che la produzione di leptina durante l'endometriosi fosse intraddominale. Le differenze osservate tra i differenti fenotipi della malattia (peritoneale contro quello ovarico) avvaloravano ulteriormente questa osservazione.

Se i nostri dati venissero ulteriormente confermati rimarrebbe da chiarire le modalità di rilascio di leptina dai focolai endometriosici e/o dai depositi di grasso peritoneali.

Inoltre, un recente studio ha riportato che l'Ob-Rb è espresso nell'endometrio umano (Kitawaki et al., 2000). Il possibile ruolo di tali recettori nell'endometrio non sono chiari. Ad ogni modo è possibile ipotizzare che l'incremento di produzione di leptina durante l'endometriosi potrebbe inoltre sostenere e promuovere lo sviluppo del tessuto endometriale ectopico e l'infiammazione.

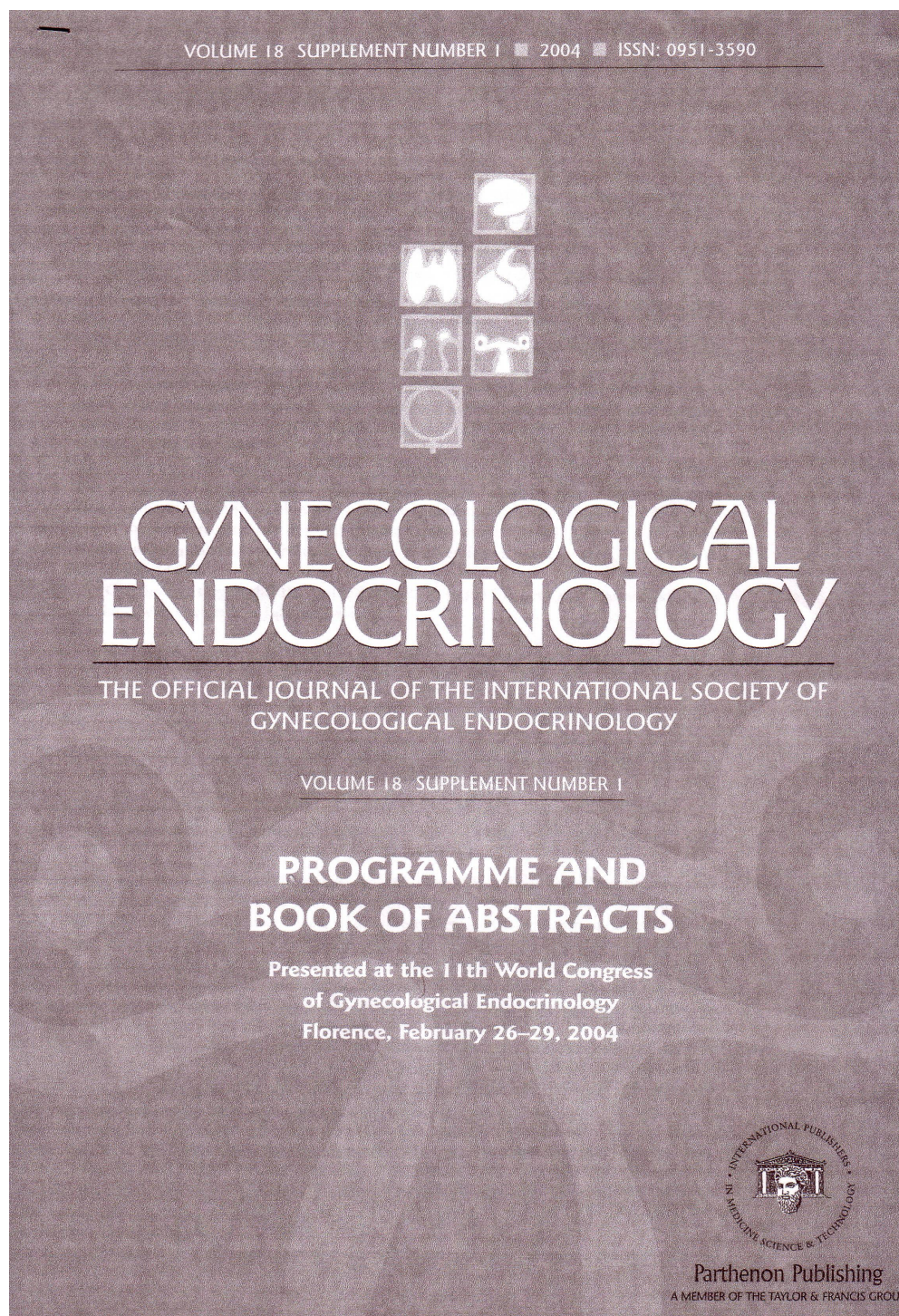
Altri fattori angiogenetici sembrerebbero essere aumentati nell'endometriosi (Oosterlynck et al., 1993). Infatti, le concentrazioni del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) sono aumentati significativamente nel fluido peritoneale di donne con endometriosi (McLaren et al., 1996a) e ciò sembra essere correlato alla severità della malattia (Shrifren et al., 1996). I macrofagi peritoneali sono probabilmente la principale fonte di VEGF. Il rilascio di VEGF da queste cellule sembra essere regolata dagli ormoni steroidei ovarici (McLaren et al., 1996b). Anche l'Interleuchina-8 (IL-8), una citochina chemioattrattiva ed angiogenica, è aumentata nel fluido peritoneale delle pazienti con endometriosi, specialmente nei primi stadi della patologia (Gazvani et al., 1998). I livelli di IL-8 sono, inoltre, correlati con l'estensione dell'endometriosi (Iwabe et al., 1998).

Ulteriori studi sono attualmente in corso allo scopo di osservare le relazioni tra leptina ed i suddetti fattori angiogenici.

In conclusione, il nostro studio conferma che i livelli di leptina nel PF sono più alti in pazienti affette da endometriosi. Tuttavia, tale incremento di leptina non è stato rilevato in pazienti che non presentavano impianti peritoneali. I nostri dati suggeriscono che lo sviluppo delle cisti endometriosiche ovariche e degli impianti peritoneali potrebbero essere determinati da differenti meccanismi patogenetici.



## Allegato 2





# ENDOMETRIOSIS: AN ENIGMA BETWEEN THE IMMUNE SYSTEM AND THE ENDOMETRIUM

C. Alviggi, R. Clarizia, C.C. Cadente, M.L. Borrelli, G. Castaldo, T. Pagano, G. De Placido  
 Dipartimento di Scienze Ostetriche Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione,  
 Università di Napoli "Federico II", Italy

The most accredited pathogenic model for pelvic endometriosis (PE) is the so called "implantation theory": it considers that the lesions are due to the implantation of endometrial tissue refluxed into the peritoneal cavity throughout the tubes during menstruation. Retrograde menstruation occurs in almost all women; the discrepancy between the incidence of this phenomenon and the occurrence of PE might be presence of further "permissive" variables, including anomalies of the peritoneal microenvironment, a defective cell-mediated scavenging/cytolysis system in the peritoneal cavity, and the intrinsic features of refluxed endometrium. Molecules present in the peritoneal microenvironment are hormones, cytokines, growth and angiogenic factors, all potentially permissive for implantation and growth. An abnormal cell-mediated scavenging/cytolysis system may account for anomalies in the production of soluble factors and for a defective removal of ectopic cells. Natural killer (NK) lymphocytes, T cells and macrophages seem to be involved in this removal activity, whereas anomalies in their functions have been reported during the disease. Dysfunctional macrophage activity may also be involved in the dysregulation of the B cells and the production of autoantibodies. The last relevant aspect in pathogenesis of PE is the features of refluxed endometrium. Indeed, it has been recently observed that endometrial cells from patients affected display many differences when compared with those of normal women, mainly in terms of expression of adhesion molecules, matrix metalloproteinases (MMPs), and anti-apoptotic genes, such as bcl-2. More recently, angiogenesis is thought to be of fundamental importance in the early stages of the disease.

Leptin is an adipocyte derived hormone with pleiotropic functions, including proinflammatory/angio-

genic and immuno-regulatory properties. It is also able to promote the expression of bcl-2, adhesion molecules and MMPs. A large amount of adipose tissue is present in the peritoneal cavity, but to our knowledge no data exist about its potential involvement in the regulation of local immune response, inflammation and angiogenesis. On this basis, we have recently investigated the production of leptin during PE. Our studies demonstrated that the levels of this hormone in serum and peritoneal fluid of patients affected are significantly increased when compared with those of age and BMI matched healthy controls. This hormone may represent the "missing link" able to aggregate different pieces of the complex puzzle of endometriosis. Its abnormal production by the peritoneal fat may promote ectopic cells survival by decreasing their apoptotic regression; indeed, leptin might favour cell adhesion and growth by inducing the production of adhesion molecules and MMPs, respectively. Following confirmation of this hypothesis, the development of agents antagonising leptin action and nutritional intervention aimed at reducing circulating/peritoneal leptin concentrations may be of potential interest as novel therapeutic tools in the treatment of the disease.

### **Allegato 3**



**WORLD MEETING ON  
MINIMALLY INVASIVE SURGERY IN GYNECOLOGY**

**PROCEEDINGS  
and ABSTRACTS BOOK**

**SECOND SEGi MEETING**  
Societate Romana Endoscopie Ginecologica

# **LAPAROSCOPIC TEMPORARY OVARIAN SUSPENSION TO PREVENT RECURRENCE OF OVARIAN ENDOMETRIOMAS**

**C. Carravetta\*, S. Conforti, C. Cadente, ML Borrelli, M. Molis,  
S. Ronsini, G. De Placido**

Dept of Ob/Gyn, University of Naples "Federico II", Naples, Italy

## **Objective of investigation**

To describe and evaluate the safety of a simple laparoscopic technique of temporary ovarian suspension to reduce the recurrence of ovarian endometriomas.

## **Methods used**

Eleven women affected by ovarian endometriomas associated with adhesion of ovaries to peritoneum of ovarian fossa, underwent ovarian suspension to the round ligament after treating ovarian cysts. Suspension was carried out with a 2/0 absorbable suture with a short absorption time placed under round ligament and comprising the ovarian tissue. ovarian endometriomas were excised or fenestrated and coagulated.

Patients were followed-up by vaginal sonography to detect cyst recurrence.

## **Results**

No intra-operative complication was recorded and all patients were discharged the day after operation. In all cases the post-operative period was uneventful. At 6 months follow-up no cyst recurrence was detected.

## **Conclusion**

Our technique for laparoscopic temporary ovarian suspension is easy to perform and this preliminary series shows that is a safe procedure. A prospective randomized trial is now ongoing to evaluate the effectiveness in reducing the risk of cyst recurrence.